

Využití imunofluorescenčního značení pro sledování vlivu vybraných inhibitorů proliferace na fosforylaci nucleophosminu na threoninu 199 v nádorových buňkách.

Teoretický úvod

Imunofluorescenční značení

Metoda imunofluorescenčního značení patří mezi nejvýznamnější experimentálně biologické a biomedicínské techniky s širokým spektrem využití v praxi. Podstatou je vazba primární protilátky na antigen našeho zájmu. Následuje vazba sekundární protilátky konjugované s fluorochromem rozpoznávající imunoglobuliny organismu, z něhož pochází primární protilátka. Jinou možností je značení antigenu přímo primární protilátkou značenou fluorochromem. Po excitaci zářením příslušné vlnové délky ve fluorescenčním mikroskopu molekula fluorochromu emituje záření o vyšší vlnové délce (tedy nižší energii) ve viditelné oblasti spektra. Imunofluorescenční značení umožňuje takto vizualizovat například subcelulární lokalizaci vybraných struktur, relativní úroveň exprese proteinů, aktivací stav proteinů (například přes jejich fosforylační status) atd. Perspektiva této moderní metody spočívá v teoretické možnosti vizualizovat jakýkoliv genový produkt na buněčné úrovni.

Teorie vytvoření mikroskopického preparátu

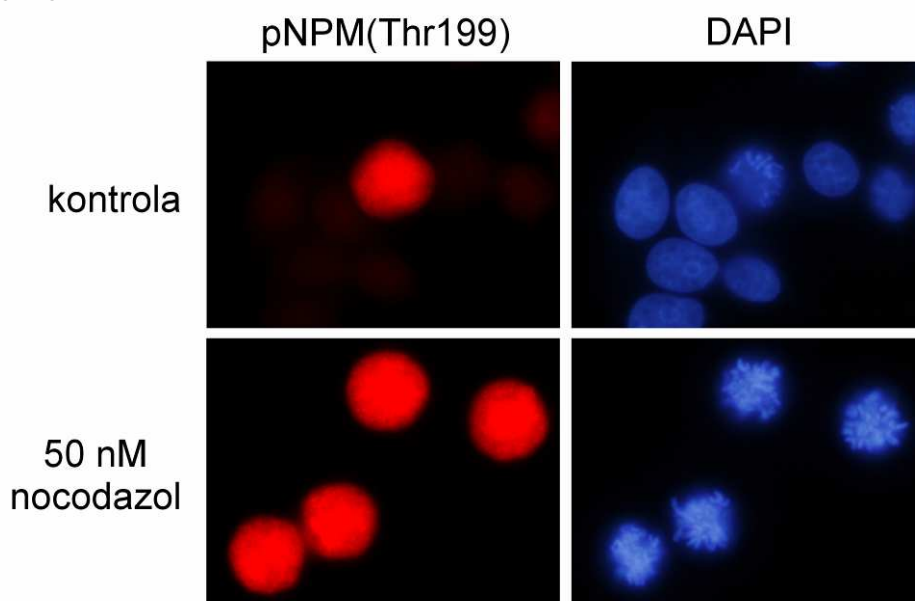
Pro vytvoření mikroskopického preparátu jsou vhodné adherentní buněčné linie rostoucí přisedle na kultivační podložce, kterou může být i krycí sklíčko. Na ně je optimalizován i následující protokol. Buňky suspenzní, rostoucí v celém objemu media, vyžadují speciální přístup. Buňky jsou vysazovány do šestijamkových panelů, do kterých se předtím vloží sterilní krycí sklíčko. Přibližně po 24h inkubaci při 37 °C, 5 % CO₂ a 100% vlhkosti (pro každou linii je počet hodin nutných k adhezi nutné optimalizovat) jsou buňky ovlivněny inhibitory proliferace a kultivovány po požadovanou dobu v inkubátoru. Po promytí je nutné buňky zafixovat, což se provádí buď pomocí organických rozpouštědel nebo aldehydů. Organická rozpouštědla (alkoholy a aceton) odstraňují lipidy, dehydratují buňky a zároveň precipitují proteiny buněčné architektury. Aldehydy (např. paraformaldehyd, formaldehyd/gluteraldehyd) tvoří intra a zejména intermolekulární mosty mezi volnými aminoskupinami a vytváří kovalentní sítě antigenů. Aldehydy konzervují strukturu proteinů lépe než organická rozpouštědla, ale redukují antigenicitu některých složek buňky. Výběr fixativa závisí na detekovaném antigenu. Pro volný přístup protilátky k antigenu je nutná permeabilizace buněk. Fixování pomocí alkoholů a acetonu zároveň narušuje integritu membrán, permeabilizační krok tedy není nutný. Aldehydy však tuto vlastnost nemají, a proto je třeba permeabilizaci provést např. pomocí zředěných roztoků detergentů (0,5% Triton-X/PBS). Před vlastní aplikací protilátek je nutné sklíčko vyblokovat, tzn. zabránit nespecifické vazbě protilátek. Toho je obvykle dosaženo inkubací sklíček s roztokem BSA (hovězí sérový albumin) nebo s fetálním sérem, které BSA také obsahuje. Dále následuje inkubace s primárními, sekundárními protilátkami, popř. dalšími fluorescenčními próbami

(např. DAPI). Při aplikaci protilátek konjugovaných s fluorochromy je nutné inkubaci provádět ve tmě. Na závěr jsou ze sklíček s buňkami vytvořeny mikroskopické preparáty pomocí tzv. montovacích médií (50% glycerol, mowiol). Pozorování se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu pod různými filtry v závislosti na sledovaném fluorochromu.

Nucleophosmin (NPM)

Nucleophosmin nebo také protein B23 je nukleolární fosfoprotein podílející se na tvorbě a transportu ribosomů, duplikaci centrosomů, regulaci DNA polymerasy α , regulaci proteinu p53 atd. Je lokalizován v jadérku, ale v případě sérové nedostatečnosti nebo účinkem některých protinádorových léčiv může být translokován do nucleoplazmy. Mimo to je také přítomen v cytoplazmě a je asociován s centrosomy. Během mitózy je tento protein fosforylován na threoninu 199 enzymy regulujícími buněčný cyklus, konkrétně komplexem CDK1/cyklin E. Účinkem některých protinádorových léčiv může docházet k zastavení buněčného cyklu v mitóze, což může být pozorováno právě vizualizací fosforylované formy NPM.

Příklady výsledků:



Obrázek 1: Detekce fosforylace nucleophosminu na threoninu 199 během mitózy v buňkách prsního karcinomu MCF7.

Pracovní postup:

Biologický materiál

nádorové buňky prsního karcinomu MCF7 (kontrolní či ovlivněné inhibitory proliferace),

Vybavení a pomůcky

šestijamkový panel, pinzeta, podložní sklíčka, destička obalená parafilmem, fluorescenční mikroskop Olympus vybavený digitální kamerou CoolSnap, sada pipet a špiček

Chemikálie, roztoky a protilátky:

anti-NPM

anti-pNPM(Thr199)

DAPI (10 mg/ml)

DMEM/FS (kultivační médium DMEM s 10 % fetálním sérem)

mowiol

4% paraformaldehyd

PBS (fosfátový pufr)

PBS-T (0,1%Tween/PBS)

sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená Alexa Fluor 647

Vlastní postup:

1. Buňky jsou kultivovány na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, 100% vlhkost).

Promývání:

2. 2x 1 ml PBS, 2 min.

Fixace a permeabilizace buněk:

3. Odsaj PBS.
4. Opatrně přidej 1 ml 4% paraformaldehydu.
5. Inkubuj 10 min při pokojové teplotě..
6. Zafixovaná sklíčka lze v tomto stavu uchovávat v +4 °C.

Promývání

7. 3x 1 ml PBS, 2 min

Permeabilizace:

8. 1 ml 1% Triton X/PBS, 5 min.

Promývání

9. 3x 1 ml PBS, 2 min

Blokování:

10. 1 ml DMEM/FS, 15 min

Primární protilátka anti-pNPM(Thr199)

11. Nařed' zásobní roztok protilátky anti-pNPM(Thr199) 100x do DMEM/FS (na 1 sklíčko počítej 25 µl)
12. Nanes 25 µl roztoku primární protilátky na destičku obalenou parafilmem, přiklop krycí sklíčko s buňkami naspod a ulož vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
13. Inkubuj 1 hod při laboratorní teplotě ve tmě!!!.

Promývání

14. 1 ml PBS, 2 min
15. 1 ml PBS-T, 2 min
16. 1 ml PBS, 2 min.

Sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená AF647

17. Nařed' zásobní roztok sekundární protilátek do DMEM/FS (na 1 sklíčko počítej 25 µl) **100x**
18. Nanes 25 µl roztoku sekundární protilátky na destičku obalenou parafilmem, přiklop krycí sklíčko s buňkami naspod a ulož vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
19. Inkubuj 1 hod při laboratorní teplotě ve tmě!!!.

Promývání

20. 1 ml PBS, 2 min
21. 1 ml PBS-T, 2 min
22. 1 ml PBS, 2 min.

DAPI

23. Nařed' **2000x** zásobní roztok DAPI 10 mg/ml do PBS (konečná koncentrace 5 µg/ml).
24. Přidej do každé jamky 1 ml roztoku DAPI.
25. Inkubuj 10 min při laboratorní teplotě ve tmě.

Promývání

26. 1 ml PBS, 2 min
27. 1 ml PBS, 2 min
28. 1 ml H₂O, 2 min.

Vytvoření trvalého preparátu

29. Nanes na podložní sklíčko 5 µl mowiolu a přiklop sklíčko buňkami na spodní straně.
30. Preparát lze ihned pozorovat, pro použití imerzního objektivu je však třeba nechat mowiol ztuhnout do druhého dne při 4 °C.

Uchovávání preparátů

31. Sklípka jsou uchovávána ve tmě při 4 °C.